

II. TINJAUAN PUSTAKA

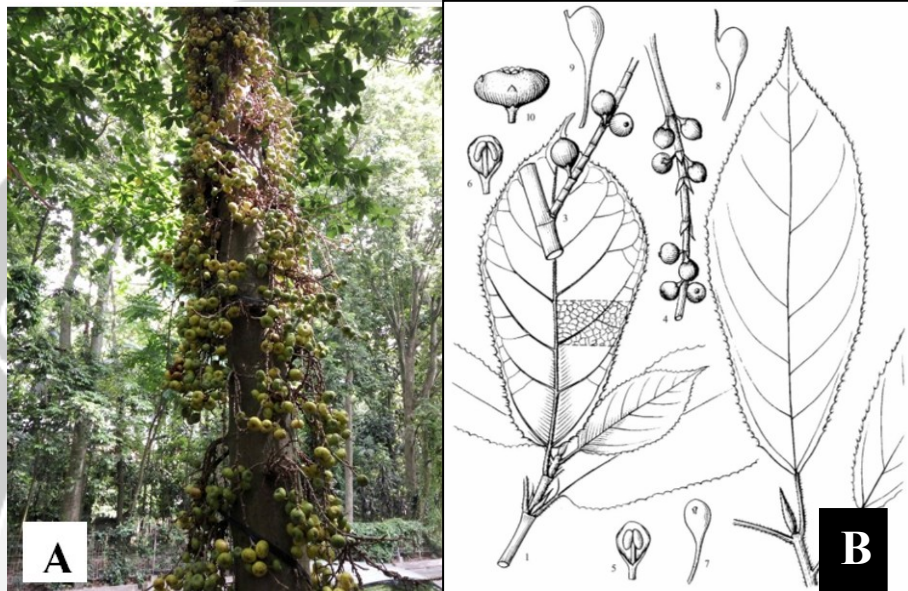
A. Buah Luwingan (*Ficus hispida* L.f.)

Tumbuhan dengan genus *Ficus* merupakan salah satu golongan tumbuhan penting dari 700 jenis *Ficus* karena tidak hanya keberadaannya terkait dengan nilai religius sebagai persembahan ibadah keagamaan tetapi juga karena nilai medis yang dimiliki. Salah satu genus *Ficus* yang berpotensi adalah *Ficus hispida*. Tumbuhan ini tersebar di beberapa negara tropis seperti India, Sri Lanka, Myanmar, China bagian selatan, Papua Nugini, Queensland-Australia, dan Indonesia dengan nama daerah Peyatti (Tamil), Dummor (Bengali), Ma Dau Plong (Thailand), Luwingan (Indonesia) dan Gobla (Hindi) (Shanmugarajan dkk., 2008).

Tumbuhan luwingan merupakan tumbuhan yang tergolong dalam suku Moraceae dengan habitus pohon yang mampu bertumbuh pada ketinggian hingga mencapai 1200 mdpl. Secara fisik, pohon ini banyak tumbuh di daerah lahan terbuka, tepi sungai, dan hutan sekunder dengan ketinggian pohon mencapai 15 m, batang berwarna coklat, bercabang banyak, batang berwarna abu-abu dan bergetah. Tumbuhan ini tergolong tumbuhan berumah dua dengan setiap individu memproduksi syconia betina yang mengandung bunga betina yang akan menjadi bakal biji buah, sedangkan syconia jantan mengandung pollen (Lee dkk., 2013).

Tumbuhan luwingan (Gambar 1) memiliki daun berbentuk menyerupai jantung, ujung meruncing, dan berbulu. Selain itu, daun luwingan memiliki tipe percabangan *opposite* dengan permukaan atas dan bawah memiliki bulu

kasar berwarna putih atau coklat. Pohon luwingan akan mulai berbuah pada usia 3 tahun dengan buah bergerombol sekitar 10-20 buah dalam sebuah tandan (Lee dkk., 2013).



Gambar 1. Pohon Luwingan yang tumbuh di area kebun Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada (A); Ilustrasi Bagian daun, bunga, dan bakal buah luwingan (B) (Sumber : Dokumentasi pribadi, 2016)

Keterangan : Tinggi pohon mencapai 20 m, buah bergerombol dalam 1 tangkai, daun berbentuk lonjong berukuran 3-12 x 1-3 cm, tepi daun bergerigi dan permukaan daun hijau serta berbulu (Lee dkk., 2013)

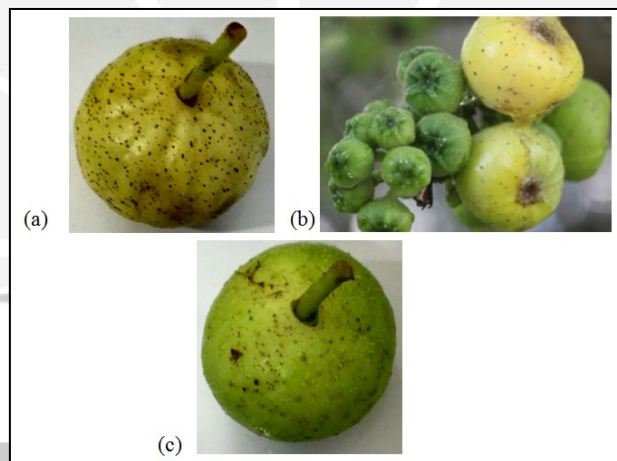
Menurut Backer dan Brink (1965) dalam Utami (2016), klasifikasi tumbuhan luwingan sebagai berikut :

Kerajaan	:	Plantae
Divisi	:	Magnoliophyta
Kelas	:	Magnoliopsida
Bangsa	:	Urticales
Suku	:	Moraceae
Marga	:	Ficus
Jenis	:	<i>Ficus hispida</i> L.f.

Sebagian besar bagian dari tumbuhan *Ficus hispida* dapat dimanfaatkan dalam pengobatan tradisional untuk berbagai penyakit seperti

antidiare, astringent, hepatoprotektif, antitusif, antipiretik, anti inflamator, hemostatik, agen anti ulkus, dan anemia (Mandal dan Kumar, 2002 ; Peraza-Sanchez dkk., 2002). Buah luwingan (*Ficus hispida* L.f.) telah banyak digunakan sebagai pengobatan tradisional di India dan Nepal sebagai pakan ternak (Ripu dkk., 2006).

Buah luwingan (Gambar 2) memiliki lapisan epidermis dengan kutikula. Lapisan epidermis ini memiliki 4-6 lapisan kolenkim heksagonal atau poligonal. Bagian mesocarp besar dengan bentuk oval atau poligonal dilindungi oleh sel parenkim (Mandal dan Kumar, 2002).



Gambar 2. Buah luwingan (*Ficus hispida*) (Sumber : Dokumentasi pribadi, 2016)
Keterangan : buah matang berwarna kuning (a), gerombolan buah dalam tangkai pohon (b), buah muda (c)

Tumbuhan luwingan banyak tumbuh di Indonesia khususnya di daerah Yogyakarta yang ditanam oleh Pemerintah Daerah DIY pada proyek Taman Kehati di Desa Tepus, Kabupaten Gunung Kidul sebagai keanekaragaman tumbuhan lokal di DIY (Kehati, 2009 dalam Fitria dkk., 2015). Buah luwingan yang telah mendapat perhatian dari Pemerintah Daerah DIY belum

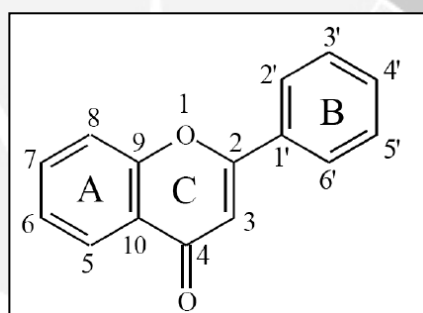
diminati oleh sebagian besar masyarakat karena rasa dan bentuknya yang kurang menarik, namun buah ini telah digunakan sebagai campuran pakan ayam/itik (dedak) yang dapat meningkatkan produksi telur di DIY (Kehati, 2009 dalam Fitria dkk., 2015). Penelitian mengenai potensi dan keamanan buah luwingan masih terbatas pada pemanfaatan daun, batang, kulit pohon, dan akar. Buah luwingan kaya akan kalsium, fosfor, dan zat besi dengan tekstur daging lembut dan berbiji kecil. Buah luwingan merupakan buah yang tumbuh sepanjang tahun (Corlett, 2006 ; Kuaraksa dkk., 2012).

Buah tin (*Ficus carica*) sebagai buah yang memiliki kesamaan genus dengan buah luwingan diketahui mengandung senyawa aktif alkaloid, antosianin, kumarin, fenol, flavonoid, glikosida, karbohidrat, protein, saponin, tanin, terpen, dan sterol (Lansky dan Paavilenia, 2011 dalam Fitria dkk., 2015). Kesamaan genus antara 2 jenis buah ini menimbulkan dugaan bahwa adanya kesamaan kandungan senyawa aktif dan potensi di dalam buah luwingan. Selain manfaat yang didapat dari senyawa flavonoid dan saponin yang mampu menurunkan kadar lipid pada tikus dislipidemia berdasarkan penelitian Utami (2016) namun flavonoid dan saponin sebagai senyawa kimia juga dapat menyebabkan toksisitas pada beberapa organisme. Saponin menyebabkan sel darah merah pecah karena hilangnya integritas dinding sel sedangkan toksisitas flavonoid terkait dengan interaksi obat seperti timbulnya gagal hati, dermatitis, anemia hemolitik dan kanker payudara (Neldawati dkk., 2013). Perlunya pengujian tentang dosis dan toksisitas kedua senyawa

ini mutlak diperlukan sebelum aplikasi buah luwingan digunakan sebagai bahan pengobatan tradisional.

B. Flavonoid

Flavonoid adalah senyawa fenol alam yang terdapat dalam hampir semua tumbuhan. Flavonoid umumnya terdapat dalam tumbuhan dalam kondisi terikat dengan gula sebagai glikosida dan aglikon flavonoid terdapat dalam berbagai bentuk struktur seperti pada Gambar 3.



Gambar 3. Struktur umum flavonoid golongan flavon (Sumber : Sudirman, 2014)

Keterangan : struktur kimia rangka flavonoid jenis flavon membentuk rantai C₆-C₃-C₆ dengan nama 2-fenil-1,4-benzopiron dengan 15 atom karbon (A dan B : cincin benzen C₆ dan C : rantai propan C₃) (Singh dkk., 2014)

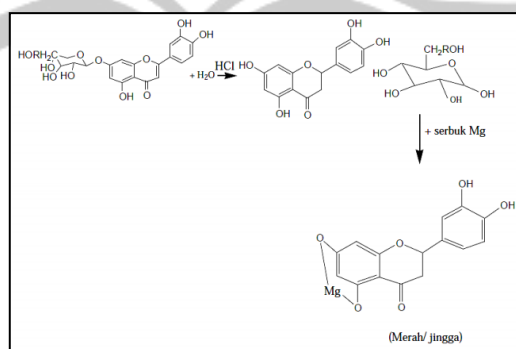
Buah luwingan diketahui mengandung flavonoid, karbohidrat, protein, saponin, tanin, terpen, dan sterol (Lansky dan Paavilenia, 2011 dalam Fitria dkk., 2015). Perbedaan kadar flavonoid dalam buah muda dan matang yang ditunjukkan dengan perbedaan warna buah serta menjadi alasan pengujian keamanan buah luwingan menggunakan buah muda dan matang. Kadar flavonoid berhubungan tingkat kemasakan buah dimana peningkatan warna buah putih pada saat masak turut meningkatkan kadar flavonoid (Marinova dkk., 2005 dalam Puspitasari, 2016). Menurut penelitian Puspitasari (2016) buah luwingan muda mengandung senyawa flavonoid sebanyak 0,211 mg/50

mg buah sedangkan pada buah luwungan matang mengandung 0,317 mg/50 mg buah.

1. Uji kualitatif

Analisis fitokimia merupakan rangkaian penting dalam suatu pengujian keamanan suatu bahan karena komponen bioaktif di dalam buah harus diketahui mempunyai efek racun atau efek farmakologis jika diujikan terhadap makhluk hidup (Harborne, 1987). Metode untuk pengujian flavonoid secara kualitatif dapat dilakukan melalui metode uji warna dengan pereaksi NaOH, H₂SO₄ pekat, dan serbuk Mg-HCl. Metode ini dilakukan karena memiliki kelebihan sederhana, praktis dan cukup akurat terutama untuk sampel cair (Mabry dkk., 1970).

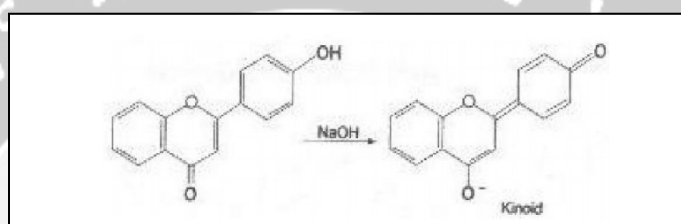
Magnesium dan asam klorida pada uji Wilstater akan bereaksi membentuk gelembung-gelembung yang merupakan gas H₂ sebagai hasil positif dengan mereduksi inti benzopiron yang terdapat pada struktur flavonoid sehingga membentuk perubahan warna menjadi jingga (Gambar 4).



Gambar 4. Reaksi Mg-HCl dalam pengujian flavonoid
(Sumber : Marlina dkk., 2005)

Keterangan : Reaksi yang terjadi setelah penambahan HCl akan terbentuk warna kuning-jingga dan akan terbentuk gelembung-gelembung setelah dibubuhi serbuk Mg.

Pengujian Bate Smith-Matcalfe dengan pereaksi H_2SO_4 pekat akan menghasilkan reaksi positif jika terjadi perubahan warna merah tua sampai ungu. Pengujian flavonoid menggunakan larutan NaOH dengan reaksi positif terdapat perubahan warna dibandingkan dengan kontrol. Reaksi yang terjadi antara flavonoid dalam sampel dan larutan NaOH terlihat pada Gambar 5.



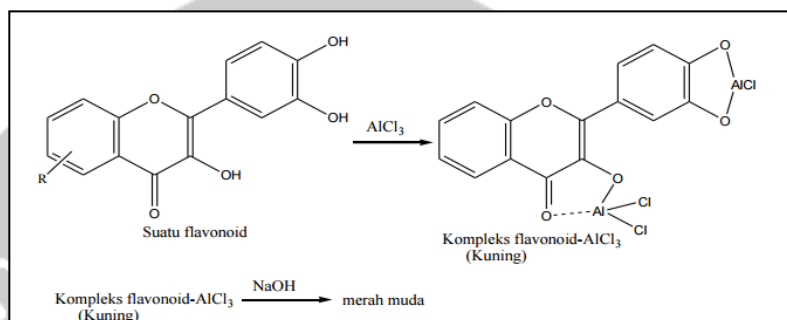
Gambar 5. Reaksi Flavonoid dengan larutan NaOH (Sumber : Robinson, 1995)
Keterangan : NaOH akan bertindak sebagai pengikat flavonoid dan membentuk warna kuning

2. Uji Kuantitatif

Pengujian flavonoid total dapat dilakukan dengan menggunakan metode spektrofotometri pada kompleks flavonoid- AlCl_3 . Pengujian ini menggunakan nilai absorbansi yang diukur pada panjang gelombang 510 nm. Dasar penentuan kandungan flavonoid secara spektrofotometri yang digunakan dalam penentuan adanya kemampuan flavonoid untuk membentuk kompleks dengan AlCl_3 membentuk warna kuning, yang kemudian bereaksi dengan basa kuat (NaOH) membentuk warna merah muda yang diukur absorbansinya pada λ 510 nm (Fernandes dkk., 2012).

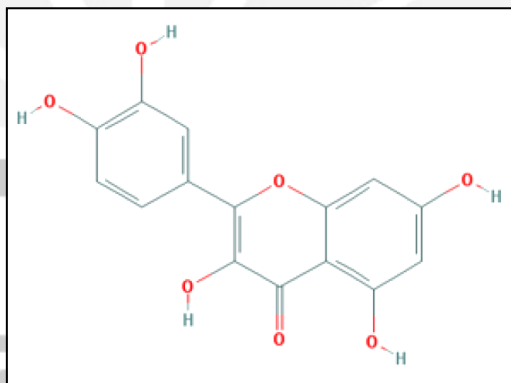
Metode kolorimetri menggunakan Aluminum klorida dan berdasarkan pada pembentukan kompleks antara Aluminum klorida dengan gugus keton C-4 dan gugus hidroksil C-3 atau C-5 kelompok flavon dan flavonol

yang menghasilkan warna kuning (Gambar 6). Selain itu, juga membentuk kompleks asam labil dengan gugus orto-dihidroksil dalam cincin A atau B flavonoid (Fernandes dkk., 2012).



Gambar 6. Reaksi pengujian total flavonoid dengan pereaksi AlCl_3 dalam suasana basa (NaOH) (Sumber : Mabry dkk., 1970)

Keterangan : flavonoid akan diikat oleh AlCl_3 dan membentuk warna kuning sedangkan setelah penambahan NaOH akan terbentuk warna merah muda. Hasil positif ditandai dengan warna merah muda atau kuning.



Gambar 7. Struktur kimia standar Quersetin (Sumber : Anonim, 2015)

Keterangan : Standar Quersetin tergolong dalam flavonol yang jumlahnya paling banyak dijumpai pada sebagian besar tumbuhan

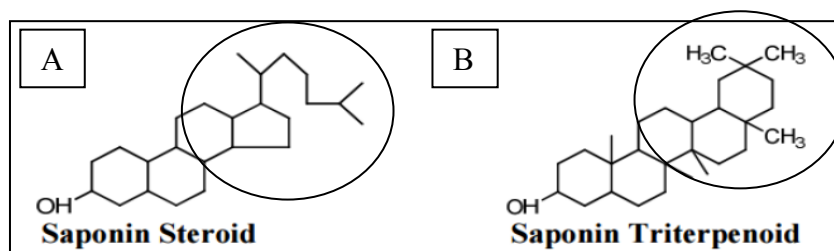
Kuersetin (Gambar 7) sebagai standar pada pengujian total flavonoid sesuai untuk membuat kurva kalibrasi sehingga larutan standar kuersetin berbagai konsentrasi digunakan untuk membuat kurva kalibrasi. Metode kolorimetri dengan pereaksi Aluminium klorida dipilih karena sederhana, cepat, dan mudah dilakukan (Ibrahim dkk., 2011 dalam Octaviani, 2016),

metode ini relatif sederhana untuk pengujian flavonoid golongan flavon esensial (chrysin, apigenin, luteonin) dan flavonol (quersetin ($C_{15}H_{10}O_7$), myricetin, morin, rutin) dapat bereaksi dengan $Al(III)$.

C. Saponin

Saponin adalah suatu glikosida alamiah yang terikat dengan steroid atau triterpena yang tergolong dalam senyawa aktif permukaan dan bersifat menyerupai sabun jika dikocok kuat akan menimbulkan busa. Sama halnya dengan flavonoid, pengujian senyawa saponin harus dilakukan untuk mengetahui keamanan dan kemampuan farmakologis sebelum diujikan ke makhluk hidup. Buah luwungan diketahui mengandung saponin triterpenoid, karbohidrat, protein, flavonoid, tanin, terpen, dan sterol (Lansky dan Paavilena, 2011 dalam Fitria dkk., 2015).

Perbedaan kadar saponin dalam buah muda dan matang yang menjadi indikator pada umumnya semakin tinggi tingkat kematangan buah seiring dengan penurunan kadar saponin (Francis dkk., 2002 dalam Puspitasari, 2016) menjadi alasan pengujian keamanan buah luwungan menggunakan buah muda dan matang. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Puspitasari (2016) buah luwungan muda mengandung senyawa saponin sebanyak 2,325 mg/50 mg buah sedangkan pada buah luwungan matang mengandung 1,385 mg/50 mg buah.



Gambar 8. Struktur Saponin Steroid dan Saponin Triterpenoid
(Sumber : Jaya, 2010)

Keterangan : (A) struktur saponin dengan aglikon atau sapogenin rantai steroid, inti C_{27} ; (B) struktur saponin dengan rantai sapogenin triterpenoid ; keduanya bersifat non-polar dan dibedakan berdasarkan hasil hidrolisisnya (lingkaran) (Hawley dan Hawley, 2004)

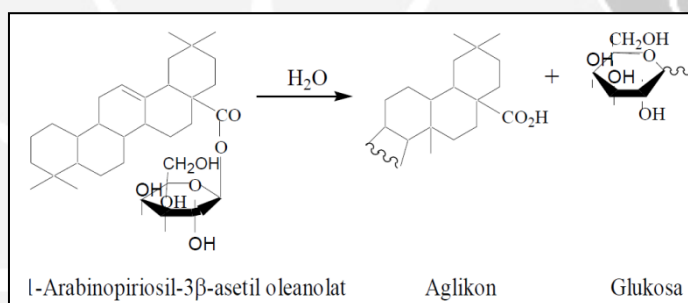
Saponin terdiri dari sapogenin yaitu bagian yang bebas dari glikosida yang disebut aglikon (Gambar 8). Jenis sapogenin atau aglikon dapat dijumpai dalam bentuk triterpenoid atau steroid. Sifat sapogenin lipofilik serta sakarida bersifat hidrofilik menjadikan saponin bersifat amfifilik. Sifat saponin inilah yang dapat merusak membran sel karena dapat membentuk ikatan dengan lipid dari membran sel serta membentuk busa (Hawley dan Hawley, 2004).

1. Uji Kualitatif

Metode pengujian keberadaan senyawa saponin dalam sampel buah dapat dilakukan dengan metode Forth yang ditunjukkan dengan adanya busa atau buih sebagai hasil positif (Harborne, 1998). Reaksi yang terjadi pada pengujian saponin hingga terbentuk busa yang stabil selama 30 detik terjadi akibat proses hidrolisis oleh air dan proses pengocokan selama 1 menit. Saponin merupakan senyawa yang mempunyai gugus hidrofilik dan hidrofob. Pada saat digojog gugus hidrofilik akan berikatan

dengan air sedangkan gugus hidrofobik akan berikatan dengan udara sehingga membentuk buih (Marliana dkk., 2005).

Menurut Robinson (1995) senyawa yang memiliki gugus polar dan nonpolar seperti saponin bersifat aktif permukaan sehingga saat dikocok dengan air, saponin dapat membentuk misel. Pada struktur misel, gugus polar menghadap ke luar sedangkan gugus nonpolarnya menghadap ke dalam. Keadaan inilah yang tampak seperti busa. Reaksi yang terjadi selama proses hidrolisis hingga terbentuk buih dapat dilihat pada Gambar 9.



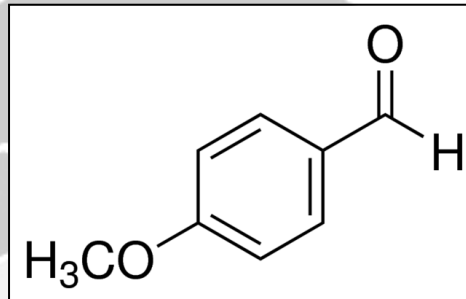
Gambar 9. Reaksi penguraian saponin spesifik melalui uji busa (Sumber : Marliana dkk., 2005)

Keterangan : Timbulnya buih merupakan hasil glikosida yang telah terhidrolis dalam air

2. Uji Kuantitatif

Pengujian total saponin dapat dilakukan dengan metode anisaldehida-asam sulfat. Anisaldehida (4-metoksibenzaldehid) (Gambar 10) adalah gugus aromatik yang menghasilkan warna biru kehijauan apabila direaksikan dengan saponin dan asam sulfat (Birk dan Peri, 1980). Penggunaan metode ini dilengkapi dengan pengukuran kadar melalui absorbansi pada spektrofotometer UV-Vis dengan standar Quija Bark. Panjang gelombang yang digunakan adalah 430 nm yang telah sesuai

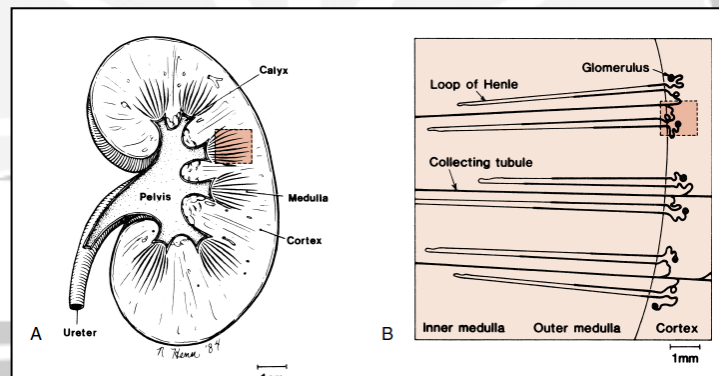
menurut Baccou dkk. (1977) dalam Octaviani (2016) yaitu pengujian senyawa saponin pada umumnya menggunakan panjang gelombang tersebut.



Gambar 10. Struktur kimia Anisaldehida (Sumber : Makkar dkk., 2007)

Keterangan : Senyawa berbentuk cair, dapat digunakan untuk mendeteksi banyak senyawa fitokimia (terpen, karbohidrat, glikosida, sapogenin, steroid, fenol)

D. Fungsi Ginjal terkait dengan Kadar Kreatinin dan *Blood Urea Nitrogen* (BUN)



Gambar 11. Struktur anatomi Ginjal Manusia (Bishop dkk., 2010)

Keterangan : struktur ginjal yang terdiri dari cortex, medula, calyx, dan ureter (A) ; Bagian dalam medula terdiri dari glomerulus, lengkung henle, dan tubulus (B)

Ginjal (Gambar 11) merupakan organ vital yang memiliki peran penting dalam menjaga kestabilan lingkungan dalam tubuh makhluk hidup. Ginjal berperan dalam mengatur keseimbangan cairan tubuh, elektrolit, dan asam basa dengan cara menyaring darah yang melewati ginjal, reabsorpsi selektif air, elektrolit, dan non-elektrolit serta mengekskresi kelebihan tersebut

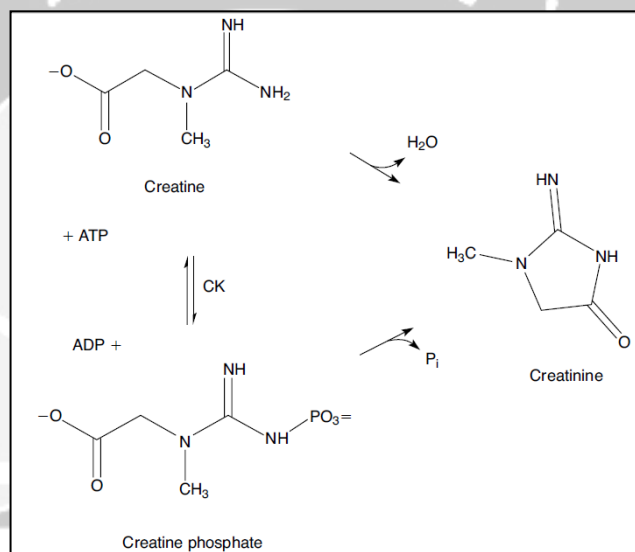
sebagai kemih (Guyton dan Hall, 2006). Ginjal juga bertugas untuk mengeluarkan sisa metabolisme (urea, kreatinin, dan asam urat) serta zat kimia asing, mensekresi renin (mengatur tekanan darah), mensekresi bentuk aktif vitamin D (mengatur kalsium), dan mensekresi eritropoietin (untuk mensintesis darah) (Price dan Wilson, 1994).

Ginjal merupakan organ eliminasi utama untuk hampir seluruh obat yang digunakan, namun demikian pada batas-batas tertentu ginjal tidak dapat melakukan fungsinya dalam eliminasi obat sehingga menyebabkan tertimbunnya obat dalam ginjal yang dapat menyebabkan cedera sel ginjal, terutama daerah tubulus proksimal (Sukardi, 1995). Ginjal sebagai organ ekskresi utama karena mengalirkan 25 % darah curah jantung melalui arteri renalis sehingga ekskresi ginjal mengalami dampak langsung atau tidak langsung dari efek samping yang disebabkan oleh zat toksin, obat, atau konsentrasi tinggi zat yang potensial merusak ginjal. Salah satu indikator gangguan fungsi ginjal dapat dilihat melalui kadar kreatinin dan urea dalam darah sebagai indikator adanya gangguan ginjal yang diakibatkan konsumsi bahan toksik (Whalan, 2015).

1. Kadar Kreatinin dalam darah

Kreatinin sendiri disintesis di hati dari arginine, glisin, dan metionin dan ditranspor ke berbagai jaringan. Kreatinin akan dikonversikan menjadi kreatin phosphate dan melalui siklus energi akan mengalami kehilangan asam fosfor dan air, kemudian berdifusi ke plasma darah dan diekskresikan ke urine. Kreatinin dibentuk dari kreatin dan

kreatin phosphate (PO_4) di otot dan diekskresikan ke dalam plasma darah yang berkaitan dengan massa otot (Bishop dkk., 2010). Kreatinin tidak direabsorpsi kembali oleh tubulus ginjal maka kreatinin dalam plasma darah dapat menjadi gambaran dari kemampuan filtrasi glomerulus dan mengindikasikan fungsi filtrasi ginjal (Mayasari, 2007). Struktur pembentukan kreatinin dapat dilihat pada Gambar 12.



Gambar 12. Reaksi pembentukan kreatinin dalam plasma darah (Sumber : Bishop dkk., 2010)

Kadar kreatinin sangat dipengaruhi oleh massa otot dimana pada tikus jantan lebih tinggi karena memiliki massa otot lebih banyak dibandingkan tikus betina. Hal ini terkait dengan dengan asal kreatinin yang merupakan hasil metabolisme kreatin dan fosfokreatin yang disintesis di otot skelet sehingga dipengaruhi oleh massa otot dan berat badan (Bishop dkk., 2010). Penurunan fungsi ginjal terjadi jika terjadi peningkatan kadar kreatinin dua kali lipat menunjukkan 50 % penurunan

fungsi ginjal, peningkatan kadar kreatinin tiga kali lipat menunjukkan 75 % penurunan fungsi ginjal (Spitalnik dkk., 2015).

Pengukuran kadar kreatinin pada umumnya digunakan untuk menentukan fungsi ginjal, adanya kerusakan di dalamnya dan untuk memantau adanya gangguan ginjal. Metode yang digunakan untuk mengukur kadar kreatinin salah satunya adalah metode Jaffe Kinetik. Metode Jaffe Kinetik menggunakan reaksi enzimatis menggunakan plasma darah yang dicampur dengan alkaline pikrat akan terbentuk kompleks warna oranye-merah kemudian diukur absorbansinya. Metode Jaffe Kinetik banyak digunakan karena cepat, relatif murah, dan mudah diaplikasikan. Sampel plasma darah harus disimpan dalam suhu rendah (di bawah 20 °C untuk penyimpanan selama 1-2 hari) untuk mencegah reaksi enzimatis yang dapat mendegradasi plasma (Bishop dkk., 2010).

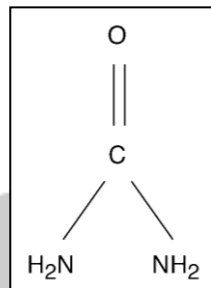
Kadar kreatinin dalam darah sangat dipengaruhi oleh jenis kelamin, aktivitas sehari-hari, serta asupan makanan yang dikonsumsi setiap hari. Konsentrasi kreatinin tertinggi dalam darah diketahui sebesar 5% dari total *non-protein nitrogen* (NPN). Kadar kreatinin normal dalam darah pada laki-laki diketahui sebesar 0,9-1,3 mg/dL sedangkan pada wanita sebesar 0,6-1,1 mg/dL (Bishop dkk., 2010). Sementara kadar kreatinin normal pada tikus putih sebesar 0,4-1,4 mg/dL (LaRegina dan Sharp, 1988).

2. Kadar *Blood Urea Nitrogen* dalam darah

Urea merupakan salah satu komponen *non-protein nitrogen* (NPN) yang terdapat dalam darah dan diketahui memiliki jumlah terbesar sekitar 45-50% dari total NPN. Urea merupakan salah satu produk ekskresi utama dalam metabolisme protein. Urea dibawa oleh aliran darah ke ginjal setelah disaring dari plasma oleh glomerulus (Bishop dkk., 2010). Untuk mengetahui kadar urea dalam darah dilakukan pengamatan terhadap kadar *blood urea nitrogen* (BUN).

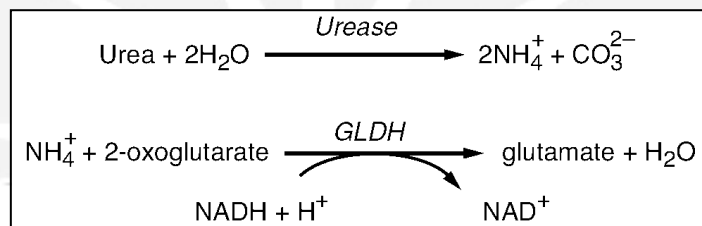
Kadar BUN digunakan untuk mengetahui kadar nitrogen ureum dalam darah. Pengukuran kadar BUN dapat dilakukan dengan menggunakan metode pengukuran kadar urea. Hal ini terkait karena nitrogen menyusun 28/60 bagian dari berat ureum sehingga untuk menentukan kadar BUN dari kadar ureum dihitung dengan menggunakan perkalian 0,467 (Bishop dkk., 2010). Kadar BUN dipengaruhi oleh faktor usia, jenis kelamin terkait massa otot, berat badan, dehidrasi, infeksi pada ginjal, dan gagal ginjal. Ciri-ciri tikus mengalami gangguan ginjal khususnya abnormalitas kadar BUN adalah muntah, anemia, peningkatan urine, penurunan berat badan, dan dehidrasi (Wientarsih dkk., 2012).

Urea (Gambar 13) terbentuk di hati dari grup amino ($-NH_2$) dan ammonia bebas terbentuk selama katabolisme protein. Pengukuran kadar *Blood Urea Nitrogen* (BUN) banyak digunakan untuk menentukan kadar urea darah (Bishop dkk., 2010).



Gambar 13. Struktur kimia Urea (Sumber : Bishop dkk., 2010)

Pengukuran kadar urea dalam darah menggunakan metode enzimatik dengan urease (Urea Amidohydrolase) yang akan menghidrolisis urea dalam sampel plasma darah dan NH_4^+ dihasilkan dari reaksi akan dikuantifikasi. Metode ini menggunakan enzim Glutamate Dehidrogenase (GLDH) pada panjang gelombang 340 nm seperti pada Gambar 14 (Bishop dkk., 2010).



Gambar 14. Reaksi enzimatik yang terjadi dalam pengukuran kadar urea darah (Sumber : Bishop dkk., 2010)

Keterangan : enzim Urease akan menghidrolisis urea menjadi ion amonium dan enzim Glutamate dehidrogenase (GLDH) akan mereduksi NADH pada panjang gelombang 340 nm

Kadar urea dalam darah dapat diukur melalui penggunaan sampel plasma. Penggunaan sampel plasma darah harus disimpan dalam suhu rendah (di bawah 20 °C untuk penyimpanan maksimal selama 7 hari) untuk proses penyimpanan karena urea rentan terhadap dekomposisi bakteri karena kandungan unsur N yang tinggi (unsur N merupakan unsur esensial bakteri untuk bertumbuh). Kadar urea normal dalam sampel plasma darah pada manusia adalah 6-20 mg/dL atau 2,1-7,1 mmol urea per

hari. Penurunan fungsi ginjal yang merupakan tanda toksik akibat konsumsi suatu bahan makanan mengakibatkan peningkatan konsentrasi urea dalam plasma darah sehingga dapat meningkatkan resiko gagal ginjal, glomerular nephritis dan gangguan ginjal lainnya. Sementara itu, penurunan konsentrasi urea dalam plasma menjadi indikator adanya gangguan hati dan gangguan penyerapan protein (Bishop dkk., 2010).

E. Fungsi Hati

Hati merupakan organ terbesar kedua dan merupakan kelenjar terbesar di dalam tubuh dengan berat sekitar 1,5 kg yang terletak pada rongga abdomen di bawah diafragma (Junqueira dan Carneiro, 2007). Hati memiliki fungsi penting dalam pembentukan dan eksresi empedu sebanyak 1 liter per hari, berfungsi memetabolisme karbohidrat, lemak, dan protein, serta berfungsi sebagai pertahanan tubuh melalui fagositosis dan imunitas, dan berfungsi detoksifikasi (Kujovich, 2005).

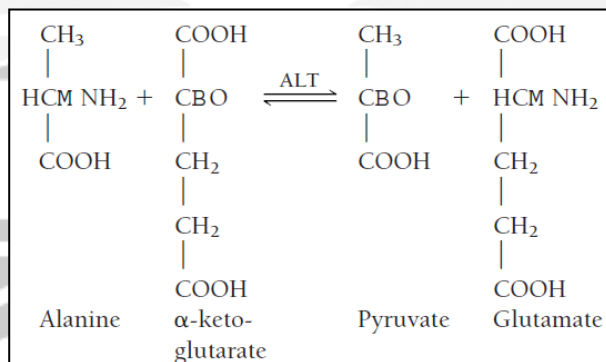
Efek toksik obat-obatan sering terlihat pada hepar, dikarenakan hepar berperan sentral dalam metabolisme obat dan bahan atau zat asing yang masuk dalam tubuh. Hepar akan mengubah struktur obat-obatan yang lipofilik menjadi hidrofilik sehingga mudah dikeluarkan dari tubuh melalui urin atau empedu (Kujovich, 2005).

Hepar merupakan organ target dalam studi toksisitas karena fungsi hepar yaitu mengumpulkan, biotransformasi dan mengeliminasi senyawa asing dalam tubuh melalui tiga sistem yaitu sistem biliari, retikuloendotelial, dan hepatosit. Fungsi ini akan meningkat bila ada sejumlah besar senyawa

kimia yang masuk atau diberikan pada hewan coba dalam uji toksisitas. Ekskresi melalui empedu memungkinkan terjadinya penumpukan senyawa asing di hepar sehingga menimbulkan efek hepatotoksik (Kujovich, 2005). Pengukuran fungsi hati dapat dilakukan dengan mengukur kadar enzim *Alanine Aminotransferase* (ALT) dan bilirubin.

1. Aktivitas *Alanine Aminotransferase* (ALT) dalam darah

Alanine Aminotransferase (ALT) merupakan enzim transferase yang mengkatalisis proses transfer grup amino dari alanine menjadi α -ketoglutarat dengan membentuk glutamate dan piruvat. Enzim ALT juga dikenal dengan nama serum *glutamic-pyruvic transaminase* (SGPT atau GPT) (Bishop dkk., 2010). Reaksi yang dikatalisis oleh ALT dapat dilihat pada Gambar 15.



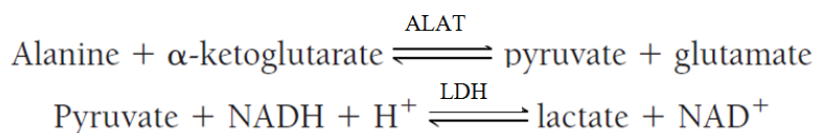
Gambar 15. Reaksi yang dikatalisis oleh enzim ALT (Sumber : Bishop dkk., 2010)

Keterangan : ALT bertindak sebagai katalisator dalam proses pembentukan piruvat dan glutamat dari alanin dan α -ketoglutarat

Pengukuran aktivitas enzim ALT menjadi indikator adanya gangguan hepatic di hati. Peningkatan dua kali lipat aktivitas enzim ALT menjadi tanda signifikan adanya gangguan sel-sel hati (Spitalnik dkk.,

2015). Kerusakan sel-sel hati menyebabkan enzim keluar dan masuk ke aliran darah. Oleh karena itu, aktivitas enzim ALT di darah dapat menjadi informasi ada atau tidaknya serta tingkat kerusakan hati (Whalan, 2015).

Metode pengukuran aktivitas ALT dalam darah menggunakan reaksi enzimatik menggunakan LDH sebagai indikator enzim yang mengkatalisis proses reduksi piruvate menjadi laktat dengan oksidasi NADH. Perubahan absorbansi diukur dengan menggunakan fotometri pada panjang gelombang 340 nm (Bishop dkk., 2010). Reaksi yang terjadi selama proses pengukuran aktivitas ALT dapat dilihat pada Gambar 16.



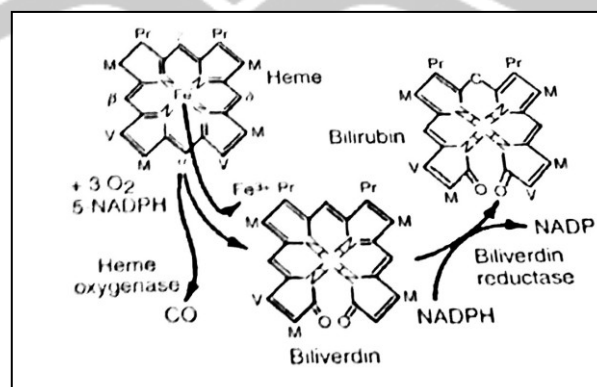
Gambar 16. Reaksi pengukuran kadar ALT (Sumber : Bishop dkk., 2010)
Keterangan : Piruvat akan direduksi menjadi laktat dengan oksidasi NADH. Aktivitas ALT dalam mengkatalisis alanin menjadi piruvat diukur pada panjang gelombang 340 nm dalam suasana pH 3-8

Senyawa kimia dalam obat-obatan cenderung meningkatkan aktivitas enzim transaminase yang bekerja di dalam sitosol dan mitokondria pada organ hati, ginjal, otot rangka, dan otot jantung (Amacher, 1998). Kerusakan struktur hepatosit diawali dengan perubahan permeabilitas membran yang diikuti dengan kematian sel. Sebelum terjadinya kematian sel, terlebih dahulu akan diawali dengan terjadinya kerusakan sel. Penyakit pada hati ditandai dengan peningkatan aktivitas enzim ALT sebanyak sepuluh kali lipat dalam waktu yang lama (Kim dkk., 2008).

Kerusakan sel hati akan memengaruhi kadar enzim-enzim hati dalam plasma darah. Jika terjadi kerusakan hati, enzim ALT akan keluar dari sel hati menuju sirkulasi darah (Bishop dkk., 2010). Aktivitas enzim ALT yang normal pada tikus putih yaitu 21-52 U/l (LaRegina dan Sharp, 1988).

2. Kadar Bilirubin dalam Darah

Bilirubin merupakan salah satu hasil ekskresi hati. Bilirubin merupakan pigmen dan terbentuk dari proses pemecahan sel darah merah. Hemoglobin yang dihasilkan dari darah akan terpecah menjadi heme, globin, dan besi. Besi akan diikat oleh transferrin, globin akan didegradasi menjadi asam amino, dan heme akan dikonversikan menjadi bilirubin dalam 2-3 jam, kemudian diikat oleh albumin menuju ke hati, dan ditransportasikan ke hepatosit. Sebelum ditransportasikan menuju hati, bilirubin dikonjugasi dengan asam glukoronat untuk membentuk bilirubin mono dan diglukoronat yang merupakan metabolit yang larut dalam air (Gambar 17). Metabolit ini akan bereaksi dengan reagen *aqueous diazo* dan secara umum disebut *direct bilirubin* (Bishop dkk., 2010).



Gambar 17. Reaksi pembentukan bilirubin (Sumber : Wang dkk., 2005)

Keterangan : Heme dalam darah membentuk biliverdin dengan bantuan heme oksigenase dan menjadi bilirubin dengan bantuan biliverdin reduktase

Kadar bilirubin akan meningkat jika terdapat sumbatan pada saluran yang mengalirkan cairan empedu dari hati. Bilirubin akan disaring dari darah oleh hati dan dikeluarkan ke cairan empedu sehingga jika hati dalam keadaan rusak akan menyebabkan bilirubin sebagian saja yang termetabolisme (Lin dan Huang, 2000). Kadar bilirubin pada tikus putih sebesar 0,0 - 0,64 mg/dL (LaRegina dan Sharp, 1988).

Pengukuran kadar bilirubin dapat dilakukan dengan metode Jendrassik dan Grof yang menggunakan reaksi diazo dengan caffein-benzoate-acetate dan asam cuka sodium (Whalan, 2015). Total bilirubin ditentukan melalui *unconjugated (indirect) bilirubin* dan *conjugated (direct) bilirubin*. Pengukuran kadar bilirubin total ini dapat menggunakan plasma darah. Sampel yang digunakan harus dihindari dari cahaya karena akan menurunkan kadar bilirubin sebesar 30-50% per jam sehingga sampel harus diletakkan pada suhu rendah (25-30 °C untuk penyimpanan selama 2 hari) dan tempat gelap. Metode Jendrassik dan Grof memiliki keunggulan diantaranya tidak dipengaruhi oleh perubahan pH dan tidak dipengaruhi oleh kadar hemoglobin (Bishop dkk., 2010).

Metode ini memiliki prinsip dasar yaitu pigmen bilirubin dalam plasma bereaksi dengan reagen diazo (*sulfanilic acid di hydrochloric acid* dan *sodium nitrite*) menghasilkan kompleks warna ungu azobilirubin yang diukur dengan spektrofotometer (Bishop dkk., 2010). Warna biru akan terbentuk dari azobilirubin oleh Alkaline Fehling-solution II. Total bilirubin dihitung menggunakan panjang gelombang 578 nm sedangkan *direct*

bilirubin diukur pada panjang gelombang 546 nm, sedangkan *indirect bilirubin* diukur melalui hasil selisih total dan *direct bilirubin* (Bishop dkk., 2010).

F. Pengujian Toksisitas Oral Sub Kronis

Pengujian toksisitas dan keamanan terhadap produk herbal dan bahan alam merupakan hal yang penting untuk dilakukan. Hal ini dibuktikan dengan pernyataan WHO yang menempatkan keamanan obat tradisional menjadi salah satu langkah penting di dalam strategi pengembangan obat tradisional periode 2014-2023 (World Health Organization, 2013). Toksisitas didefinisikan sebagai segala hal yang memiliki efek berbahaya dari zat kimia atau obat pada organisme target. Uji toksisitas terdiri atas dua jenis yaitu toksisitas umum (akut, sub-akut/sub-kronis) dan toksisitas khusus (teratogenik, mutagenik, dan karsinogenik) (Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia, 2014).

Uji toksisitas oral subkronis adalah suatu pengujian untuk mendeteksi efek toksik yang muncul setelah pemberian sediaan uji dengan dosis berulang yang diberikan secara oral pada hewan uji selama sebagian umur hewan, tetapi tidak lebih dari 10% seluruh umur hewan. Prinsip dari uji toksisitas subkronis oral adalah sediaan uji dalam beberapa tingkat dosis diberikan setiap hari pada beberapa kelompok hewan uji dengan satu dosis per kelompok (OECD, 1988).

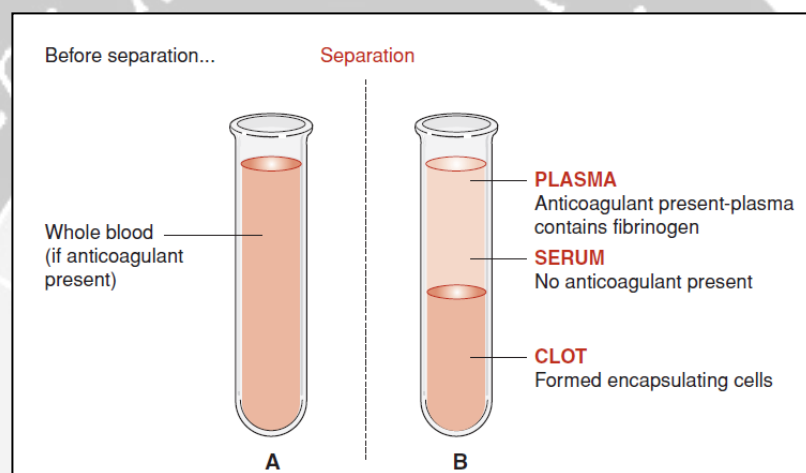
Selama waktu pemberian sediaan uji, hewan harus diamati setiap hari selama 90 hari untuk menentukan adanya toksisitas. Hewan yang mati selama

periode pemberian sediaan uji, bila belum melewati periode *rigor mortis* (kaku) segera diotopsi, organ dan jaringan diamati secara makropatologi dan histopatologi. Pada akhir periode pemberian sediaan uji, semua hewan yang masih hidup diotopsi selanjutnya dilakukan pengamatan secara makropatologi pada setiap organ maupun jaringan, serta dilakukan pemeriksaan hematologi, biokimia klinis dan histopatologi (OECD, 1988). Pengujian toksisitas sub-kronik dilakukan untuk memperoleh informasi adanya efek toksik zat yang tidak terdeteksi pada uji toksisitas akut, efek toksik setelah pemaparan sediaan uji secara berulang dalam jangka waktu tertentu, mengetahui dosis yang tidak menimbulkan efek toksik (*No Observed-Adverse Effect Level/ NOAEL*), serta mempelajari adanya efek kumulatif dan efek reversibilitas setelah pemaparan sediaan uji secara berulang dalam jangka waktu tertentu (Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia, 2014).

Penelitian toksisitas subkronik dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian tanaman obat terhadap organ tubuh yang penggunaannya dalam jangka panjang hingga timbulnya efek toksik. Uji toksisitas subkronik pada umumnya dirancang untuk mengevaluasi keseluruhan efek suatu senyawa pada hewan uji dan menggolongkannya apabila senyawa itu diberikan secara berulang sekali sehari selama masa waktu 3 bulan (90 hari) dan juga untuk memaparkan suatu bentuk efek toksik (OECD, 1988).

G. Koleksi Sampel Darah

Dalam pengujian toksisitas menggunakan parameter kimia darah dapat dilihat melalui beberapa parameter yang berkaitan dengan tujuan penelitian yaitu organ ginjal dan hati. Sampel darah yang digunakan dalam pengujian kimia darah adalah serum atau plasma darah. Komponen darah dapat dilihat pada Gambar 18.

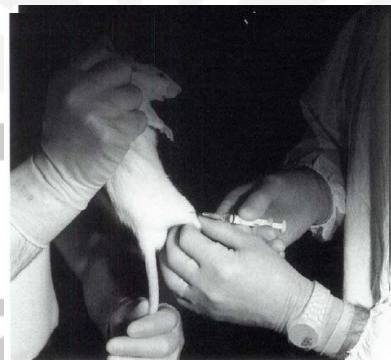


Gambar 18. Sampel darah (Sumber : Bishop dkk., 2010)

Keterangan : (A) sampel darah utuh *Whole Blood* ; (B) komposisi darah bagian atas plasma (antikoagulan dan fibrinogen), bagian tengah serum (tanpa antikoagulan), dan bagian bawah clot (sel-sel darah encapsulasi)

Proses analisis kimia darah menggunakan *whole blood* yaitu darah utuh dengan komposisinya sel darah merah, sel darah putih, dan platelet (Bishop dkk., 2010). Proses pemisahan plasma atau serum darah dapat dilakukan dengan sentrifugasi selama 10 menit. Serum memiliki karakteristik bening, berwarna kuning pucat, sedangkan plasma memiliki karakteristik bening, berwarna kuning pucat, mengandung fibrinogen, dan dikoleksi melalui penggunaan heparin dalam *tube* (Bishop dkk., 2010).

Dalam proses koleksi sampel darah dilakukan proses penyimpanan sampel darah dalam *microtube* yang dilengkapi dengan penambahan antikoagulan yaitu *ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA) yang berfungsi untuk mencegah sampel darah agar tidak menggumpal (Whalan, 2015). Mikrohematokrit digunakan untuk koleksi sampel darah melalui sinus orbitalis. Mikrohematokrit mengandung heparin untuk koleksi darah melalui pembuluh darah kapiler yang akan disimpan dalam *tube* yang berisi EDTA. Sebelum proses pengambilan darah dilakukan, proses anestesi dilakukan melalui injeksi ketamine (*ketalar*). Ketamine merupakan salah satu agen anestesi yang aman, waktu anestesi singkat, waktu *recovery* singkat, dan minimal efek samping (Bishop dkk., 2010).

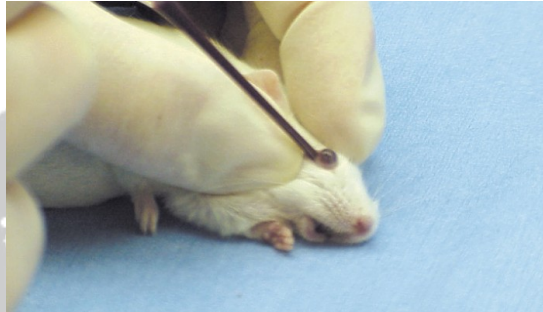


Gambar 19. Proses anestesi secara *im*. (Sumber : Krinke, 2000)

Keterangan : anestesi menggunakan ketamin dilakukan dengan mencari otot (muskular) pada bagian paha kaki dan dibantu orang lain untuk memegang tikus

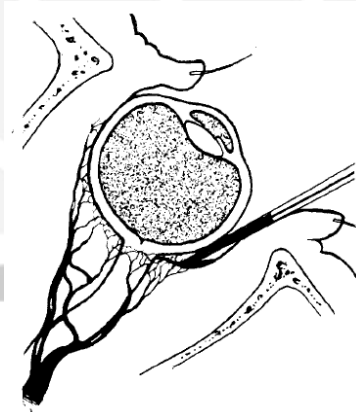
Koleksi darah dapat dilakukan melalui sinus orbitalis atau *orbital plexus* (Gambar 19). Metode ini relatif cepat dibandingkan metode lain dengan menggunakan mikrohematokrit (LaRegina dan Sharp, 1998). Pengambilan darah melalui *sinus orbitalis* tidak boleh kurang dari 2 minggu untuk satu kali pengambilan darah dan harus menggunakan anestesi. Hal ini

dikarenakan luka dalam pembuluh darah membutuhkan waktu *recovery* setelah terluka akibat mikrohematokrit (Rilley, 1960).



Gambar 20. Proses koleksi darah melalui *sinus orbitalis* (Sumber : Hoff, 2000)

Keterangan : kapiler mikrohematokrit dibagi menjadi dua bagian dan mata tikus dibuka lebar-lebar hingga kapiler masuk ke belakang mata



Gambar 21. Ilustrasi saat kapiler masuk ke belakang mata (Sumber : Rilley, 1960)

Keterangan : kapiler mikrohematokrit mengambil darah dari pembuluh vena belakang mata dengan memutar kapiler hingga darah mengalir keluar melalui kapiler

Proses koleksi darah melalui *sinus orbitalis* merupakan salah satu teknik yang beresiko cukup tinggi sehingga membutuhkan proses anestesi dan membutuhkan keahlian khusus. Proses koleksi darah diawali dengan menganestesi tikus dan dibaringkan, sambil tangan membuka mata tikus lebar-lebar dengan jari. Selanjutnya, kapiler mikrohematokrit masuk ke bagian bawah bola mata di arah 45° (Gambar 20). Putar kapiler untuk

mengeluarkan darah dan alirkan darah ke *tube* , jika sudah cukup lepaskan kapiler dan tutup mata tikus (Gambar 21).

Kebutaan dapat terjadi pada proses pengambilan darah yang salah karena kapiler mengenai saraf yang berada di bagian permukaan tengah mata. Selain itu dapat mengalami peradangan okuler, luka, kehilangan cairan mata, infeksi, atau keratitis dapat terjadi akibat kesalahan prosedur koleksi darah atau pergerakan berlebih tikus saat *blood sampling* (Hoff, 2000). Total volume darah tikus yang boleh diambil berdasarkan usia dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Maksimal volume koleksi sampel darah berdasarkan berat badan

Body weight (g)	*CBV(ml)	1% CBV every 24 hrs†	7.5% CBV every 7 days†	10% CBV every 2 - 4wks†
20	1.10 - 1.40	11 - 14 µl	90 - 105 µl	110 - 140 µl
25	1.37 - 1.75	14 - 18 µl	102 - 131 µl	140 - 180 µl
30	1.65 - 2.10	17 - 21 µl	12 - 158 µl	170 - 210 µl
35	1.93 - 2.45	19 - 25 µl	145 - 184 µl	190 - 250 µl
40	2.20 - 2.80	22 - 28 µl	165 - 210 µl	220 - 280 µl
125	6.88 - 8.75	69 - 88 µl	516 - 656µl	690 - 880 µl
150	8.25 - 10.50	82 - 105 µl	619 - 788 µl	820 - 1000 µl
200	11.00 - 14.00	110 - 140 µl	825 - 1050 µl	1.1 - 1.4 ml
250	13.75 - 17.50	138 - 175 µl	1.0 - 1.3 ml	1.4 - 1.8 ml
300	16.50 - 21.00	165 - 210 µl	1.2 - 1.6 ml	1.7 - 2.1 ml
350	19.25 - 24.50	193 - 2450 µl	1.4 - 1.8 ml	1.9 - 2.5 ml
*Circulating blood volume (1ml = 1000µl)		†Maximum sample volume for that sampling frequency		

(Sumber : National Institutes of Health (NIH), 2010)

H. Hewan Uji

Hewan percobaan merupakan setiap hewan yang dipergunakan pada sebuah penelitian biologis dan biomedis yang dipilih berdasarkan syarat atau standar dasar yang diperlukan dalam suatu penelitian (Whalan, 2015). Pengelolaan hewan percobaan diawali dengan pengadaan hewan meliputi pemilihan dan seleksi jenis hewan yang cocok terhadap materi penelitian

(Smith dan Mangkoewidjojo, 1988). Berbagai hewan kecil memiliki karakteristik tertentu yang relatif serupa dengan manusia, sementara hewan lainnya mempunyai kesamaan dengan aspek fisiologis metabolis manusia. Tikus putih sering digunakan dalam menilai mutu protein, toksisitas, karsinogenik, dan kandungan pestisida dari suatu produk bahan pangan hasil pertanian (Herlinda, 1986 dalam Ridwan, 2013).

Tikus banyak digunakan untuk penelitian dengan kajian imunologi, onkologi, fisiologi, patologi, toksikologi, farmakologi, dan neurosains (Johnson, 2012). Serangkaian percobaan menggunakan hewan model harus dilakukan terlebih dahulu (disebut penelitian praklinik) sebelum diaplikasikan kepada manusia atau primata lainnya (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988 dalam Fitria dan Mulyati, 2014)

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) banyak digunakan sebagai hewan percobaan pada berbagai penelitian (Malole dan Pramono, 1989) karena memiliki karakteristik genetik yang unik, mudah berkembang biak, murah serta mudah untuk mendapatkannya. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) atau biasa dikenal dengan nama lain *Norway Rat* berasal dari wilayah Cina dan menyebar ke Eropa bagian barat (Sirois, 2005) dan berkembang di wilayah Asia Tenggara khususnya di Filipina, Indonesia, Laos, Malaysia, dan Singapura (Adiyati, 2011).

Siklus hidup tikus putih (*Rattus norvegicus*) jarang lebih dari tiga tahun, berat badan pada umur empat minggu dapat mencapai 35-40 g dan setelah dewasa rata-rata 200-250 g, tetapi bervariasi tergantung pada galur. Tikus

jantan tua dapat mencapai bobot badan 500 g, tetapi tikus betina jarang lebih dari 350 g karena metabolisme tubuh yang berbeda serta massa otot yang tinggi pada jantan. Kebutuhan pakan bagi seekor tikus setiap harinya kurang lebih sebanyak 10-20 gram dan 20-30 mL air. Jumlah ini dapat berkurang jika pakan yang dikonsumsi sudah banyak mengandung air (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988 ; Bishop dkk., 2010).

Tikus dengan berat 200-300 gram membutuhkan area kandang seluas 23 inch dengan tinggi 7 inch. Kondisi lingkungan harus stabil yakni suhu berkisar antara 18-26 °C dan kelembaban 30-70 %, dengan 12 jam terang dan 12 jam gelap. Waktu puasa yang dianjurkan untuk tikus maksimal 4-6 jam (Bishop dkk., 2010).



Gambar 22. Tikus putih Galur Wistar (Sumber : Janvier-Labs, 2016)
Keterangan : tikus putih dengan bentuk kepala lebar, telinga dan ekor panjang, pada usia 5 minggu memiliki berat sekitar 120-150 gram (Sumber : Smith dan Mangkoewidjojo, 1988)

Menurut Myers dkk. (2014) klasifikasi tikus putih (Gambar 22) *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) yaitu sebagai berikut :

Kerajaan	:	Animalia
Divisi	:	Chordata
Kelas	:	Mamalia
Bangsa	:	Rodentia
Suku	:	Muridae
Marga	:	Rattus
Jenis	:	<i>Rattus norvegicus</i>

Keunggulan tikus putih dibandingkan tikus liar antara lain lebih cepat dewasa, tidak memperlihatkan perkawinan musiman, umumnya lebih cepat berkembang biak, sangat mudah ditangani (Gambar 23) dapat ditinggal sendirian dalam kandang asal dapat mendengar suara tikus lain, dan berukuran cukup besar sehingga memudahkan pengamatan (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988). Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) mempunyai beberapa galur tikus yang sering digunakan dalam penelitian seperti Wistar, *Sprague-Dawley*, *Long Evans*, dan *Holdzman* dengan masing-masing karakter fisik yang berbeda dan kebutuhan akan penelitian menggunakan hewan coba (Derelanko dan Hollinger, 2002).



Gambar 23. Teknik *handling* tikus putih galur Wistar (Sumber : LaRegina dan Sharp, 1998)

Keterangan : jari telunjuk dan tengah menjepit tengkuk tikus, jari tangan lain menopang bagian tengah badan tikus

Tikus *Wistar* saat ini menjadi salah satu yang strain tikus paling populer yang digunakan untuk penelitian laboratorium. Ciri dari tikus Wistar yaitu kepala lebar, telinga panjang, dan memiliki panjang ekor yang selalu kurang dari panjang tubuhnya (Sirois, 2005). Tikus Wistar (albino) dikembangkan pertama kali di Wistar Institute (Philadelphia, PA) pada tahun 1906 dengan

nama katalog WISTARAT® (Wistar Institute, 2014 dalam Fitria dan Mulyati, 2014). Galur ini terus dibiakkan hingga kini karena ideal sebagai hewan model untuk berbagai tujuan penelitian.

I. Hipotesis

Pemberian filtrat buah Luwingan (*Ficus hispida*) yang mengandung saponin dan flavonoid pada tikus putih (*Rattus novergicus*) Galur Wistar dalam uji toksisitas oral subkronis aman terhadap fungsi hati dan ginjal, yang diindikasikan melalui kadar *Alanine Aminotransferase* (ALT), bilirubin, kreatinin, dan kadar *Blood Urea Nitrogen* (BUN) berada pada kisaran normal.